

"Express Mail" mailing label number EV 339 770 042 US  
Date of Deposit April 8, 2004

Our Case No. 11333/38

**IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE**

In re Application of: )  
Yasuyuki Kawashima )  
Serial No.: To Be Assigned ) Examiner: To Be Assigned  
Filing Date: Herewith ) Group Art Unit No.: To Be Assigned  
For: Methods for Measuring Bacteria, )  
Bacteria Measuring Apparatuses, and )  
Storage Media for Storing Computer- )  
Executable Programs for Analyzing )  
Bacteria )

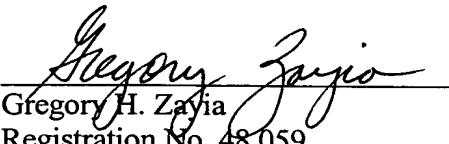
**SUBMISSION OF CERTIFIED COPY OF FOREIGN PRIORITY DOCUMENT**

Commissioner for Patents  
P.O. Box 1450  
Alexandria, VA 22313-1450

Dear Sir:

Applicant submits herewith a certified copy of Japanese Patent Application No. JP2003-106569 filed April 10, 2003, to which the above-identified United States Patent Application claims the right of foreign priority under 35 U.S.C. § 119.

Respectfully submitted,

  
\_\_\_\_\_  
Gregory H. Zavio  
Registration No. 48,059  
Agent for Applicant

BRINKS HOFER GILSON & LIONE  
P.O. BOX 10395  
CHICAGO, ILLINOIS 60610  
(312) 321-4200

日本国特許庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日      2003年 4月10日  
Date of Application:

出願番号      特願2003-106569  
Application Number:

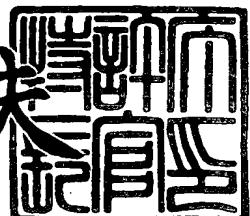
[ST. 10/C] :      [JP2003-106569]

出願人      シスメックス株式会社  
Applicant(s):

2004年 3月11日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今井康夫



【書類名】 特許願  
【整理番号】 1-2002-090  
【提出日】 平成15年 4月10日  
【あて先】 特許庁長官殿  
【国際特許分類】 G01N 33/00  
【発明の名称】 細菌測定方法と装置とプログラム  
【請求項の数】 9

## 【発明者】

【住所又は居所】 神戸市中央区脇浜海岸通1丁目5番1号 シスメックス  
株式会社内

【氏名】 河島 康之

## 【特許出願人】

【識別番号】 390014960  
【氏名又は名称】 シスメックス株式会社

## 【代理人】

【識別番号】 100065248

## 【弁理士】

【氏名又は名称】 野河 信太郎  
【電話番号】 06-6365-0718

## 【手数料の表示】

【予納台帳番号】 014203  
【納付金額】 21,000円

## 【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1  
【物件名】 図面 1  
【物件名】 要約書 1  
【包括委任状番号】 9800839

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 細菌測定方法と装置とプログラム

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 検体中の細菌を蛍光染色して試料を調製し、調製した試料中の各細菌から細菌の大きさ情報と、細菌の発する蛍光の強度を表わす蛍光情報を検出し、検出された大きさ情報と蛍光情報をパラメータとするスキャッタグラムを作成し、スキャッタグラム上の細菌の分布状態を解析し、解析結果に基づいて検体中の細菌の種類が桿菌であるか球菌であるかを判定する細菌測定方法。

【請求項 2】 細菌の分布状態を解析する工程は、分布状態の傾きを求める工程を備え、判定する工程は、前記求めた分布状態の傾きに基づいて検体中の細菌の種類が桿菌であるか球菌であるかを判定する工程からなる請求項 1 に記載の細菌測定方法。

【請求項 3】 分布状態の傾きを求める工程は、細菌の分布における最大分散方向を求め、最大分散方向の傾きを求めて分布状態の傾きとする、請求項 2 に記載の細菌測定方法。

【請求項 4】 蛍光染色した試料をサンプリングするサンプリング部と、サンプリングした試料中の各粒子から、粒子の大きさ情報を検出する大きさ情報検出器と、粒子の発する蛍光の強度を表わす蛍光情報を検出する蛍光情報検出器と、を備えた検出部と、

大きさ情報と蛍光情報をパラメータとした粒子のスキャッタグラムを作成するスキャッタグラム作成部と、

スキャッタグラムから細菌の分布状態を解析する解析部と、解析結果に基づいて検体中の細菌の種類が桿菌であるか球菌であるかを判定する判定部とからなる細菌測定装置。

【請求項 5】 解析部は分布状態の傾きを求め、判定部は前記解析部が求めた分布状態の傾きに基づいて検体中の細菌の種類が桿菌であるか球菌であるかを判定する請求項 4 に記載の細菌測定装置。

【請求項 6】 解析部は、細菌の分布における最大分散方向を求め、最大分散方向の傾きを求めて分布状態の傾きとする、請求項 5 に記載の細菌測定装置。

【請求項 7】 検体をセットする検体セット部と、  
蛍光染色試薬をセットする試薬セット部と、  
検体と蛍光染色試薬を反応させ試料を調製する反応部と、  
調製した試料中の各粒子から、粒子の大きさ情報を検出する大きさ情報検出器  
と、粒子の発する蛍光の強度を表わす蛍光情報を検出する蛍光情報検出器と、を  
備えた検出部と、  
大きさ情報と蛍光情報をパラメータとした粒子のスキャッタグラムを作成す  
るスキャッタグラム作成部と、  
スキャッタグラムから細菌の分布状態を解析する解析部と、  
解析結果に基づいて検体中の細菌の種類が桿菌であるか球菌であるかを判定す  
る判定部とからなる細菌測定装置。

【請求項 8】 判定部の判定結果に応じた出力を行なうための出力部をさ  
らに備える請求項 7 に記載の細菌測定装置。

【請求項 9】 検体中の細菌を蛍光染色して調製した試料中の各細菌から、  
細菌の大きさ情報と、細菌の発する蛍光の強度を表わす蛍光情報を検出し、大  
きさ情報と蛍光情報をパラメータとするスキャッタグラムを作成する装置にお  
いて、スキャッタグラム上の細菌の分布状態を解析し、解析結果に基づいて検体  
中の細菌の種類が桿菌であるか球菌であるかを判定する手順をコンピュータに実  
行させるプログラム。

#### 【発明の詳細な説明】

##### 【0001】

##### 【発明の属する技術分野】

この発明は、検体中の細菌を検出し、その細菌が桿菌であるか球菌であるかを  
自動的に判定する方法、装置及びプログラムに関する。

##### 【0002】

##### 【従来の技術】

試料中に含まれる細菌を検出し、その種類を判定することが、臨床検査や食品  
衛生検査の分野で行われている。細菌の種類は、細菌のグラム染色性（陽性また  
は陰性）や形状（桿菌または球菌）により分類されることが多く、グラム陰性桿

菌やグラム陽性球菌には人体に悪影響を与えるものが多い。

### 【0003】

細菌を分類する方法としては寒天培養法が最も一般的な方法である。これは試料を寒天培地に塗布し、所定時間培養して形成したコロニーを、染色又は無染色にて、顕微鏡を用いて観察者が分類する検査方法である。しかしこの寒天培養法は、基本的に用手法であり処理が煩雑であり、また培養を要するため菌種の判定までに時間がかかる。

### 【0004】

そこで、近年になって、フローサイトメータ等の粒子測定装置を用いて細菌を自動的に測定する方法が試みられ、この発明に関連する技術としては、次のようなものが知られている。

(1) 培養前・培養後の試料をフローサイトメータで測定し、両測定結果の差をとることにより試料中の夾雑物の影響による誤測定を防止する微生物の測定方法及び装置（例えば、特許文献1参照）。

(2) 細菌を含む試料にカチオン性界面活性剤を作用させて細菌の色素透過性を亢進させ、さらに色素を作用させて細菌を染色することにより、試料中に夾雑物が存在しても培養することなしに細菌を夾雑物から分離して計数する方法（例えば、特許文献2参照）。

### 【0005】

#### 【特許文献1】

米国特許第6165740号明細書

#### 【特許文献2】

特開2001-258590号公報

### 【0006】

#### 【発明が解決しようとする課題】

フローサイトメータ等の粒子測定装置によって細菌を自動的に測定する方法を用いると、比較的短時間で測定ができるが、このような方法において、より精度良く、桿菌・球菌の判別を行う方法は提案されていなかった。この発明はこのような事情を考慮してなされたもので、検体中の細菌の種類が桿菌であるか球菌で

あるかを精度良く判定する方法と装置とプログラムを提供するものである。

### 【0007】

#### 【課題を解決するための手段】

この発明は、検体中の細菌を蛍光染色して試料を調製し、調製した試料中の各細菌から細菌の大きさ情報と、細菌の発する蛍光の強度を表わす蛍光情報とを検出し、検出された大きさ情報と蛍光情報をパラメータとするスキャッタグラムを作成し、スキャッタグラム上の細菌の分布状態を解析し、解析結果に基づいて検体中の細菌の種類が桿菌であるか球菌であるかを判定する細菌測定方法を提供するものである。

### 【0008】

また、この発明は蛍光染色した試料をサンプリングするサンプリング部と、サンプリングした試料中の各粒子から、粒子の大きさ情報を検出する大きさ情報検出器と、粒子の発する蛍光の強度を表わす蛍光情報を検出する蛍光情報検出器と、を備えた検出部と、大きさ情報と蛍光情報をパラメータとした粒子のスキャッタグラムを作成するスキャッタグラム作成部と、スキャッタグラムから細菌の分布状態を解析する解析部と、解析結果に基づいて検体中の細菌の種類が桿菌であるか球菌であるかを判定する判定部とからなる細菌測定装置を提供するものである。

### 【0009】

また、この発明は検体をセットする検体セット部と、蛍光染色試薬をセットする試薬セット部と、検体と蛍光染色試薬を反応させ試料を調製する反応部と、調製した試料中の各粒子から、粒子の大きさ情報を検出する大きさ情報検出器と、粒子の発する蛍光の強度を表わす蛍光情報を検出する蛍光情報検出器と、を備えた検出部と、大きさ情報と蛍光情報をパラメータとした粒子のスキャッタグラムを作成するスキャッタグラム作成部と、スキャッタグラムから細菌の分布状態を解析する解析部と、解析結果に基づいて検体中の細菌の種類が桿菌であるか球菌であるかを判定する判定部とからなる細菌測定装置を提供するものである。

### 【0010】

さらにこの発明は、検体中の細菌を蛍光染色して調製した試料中の各細菌から

、細菌の大きさ情報と、細菌の発する蛍光の強度を表わす蛍光情報とを検出し、大きさ情報と蛍光情報とをパラメータとするスキャッタグラムを作成する装置において、スキャッタグラム上の細菌の分布状態を解析し、解析結果に基づいて検体中の細菌の種類が桿菌であるか球菌であるかを判定する手順をコンピュータに実行させるプログラムを提供するものである。

### 【0011】

#### 【発明の実施の形態】

この発明の菌種判定方法は、検体中の細菌を蛍光染色して試料を調製し、調製した試料中の各細菌から細菌の大きさ情報と、細菌の発する蛍光の強度を表わす蛍光情報とを検出し、検出された大きさ情報と蛍光情報とをパラメータとするスキャッタグラムを作成し、スキャッタグラム上の細菌の分布状態を解析し、解析結果に基づいて検体中の細菌の種類が桿菌であるか球菌であるかを判定することを特徴とする。

### 【0012】

ここで、細菌の蛍光染色には、細菌を構成する成分と結合して蛍光を発する蛍光色素を使用し、検体中の細菌を特異的に染色する方法が用いられる。例えば、以下の（1）～（11）の色素を使用すれば、細菌の細胞内物質が特異的に蛍光染色される。

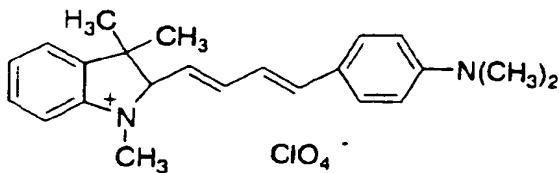
### 【0013】

（1）チアゾールオレンジ

### 【0014】

（2）

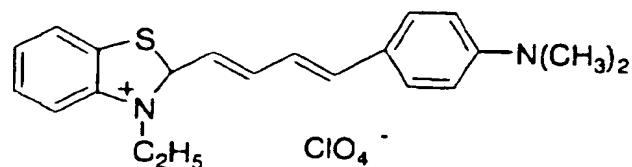
### 【化1】



### 【0015】

（3）

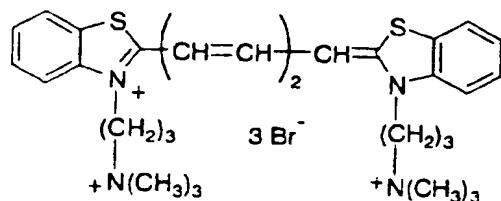
【化2】



【0016】

(4)

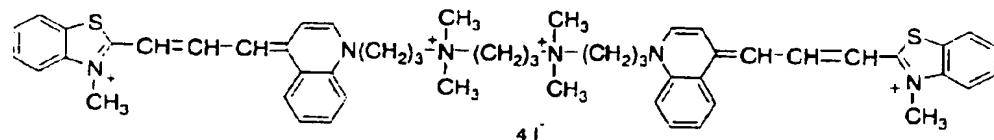
【化3】



【0017】

(5)

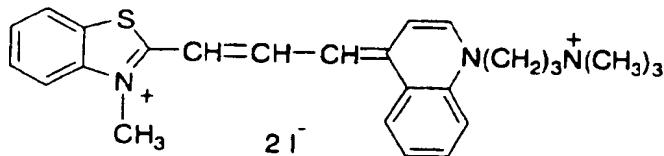
【化4】



【0018】

(6)

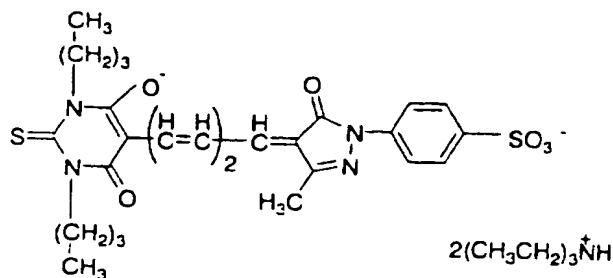
【化5】



【0019】

(7)

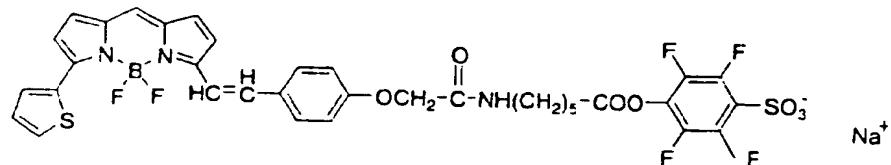
【化6】



【0020】

(8)

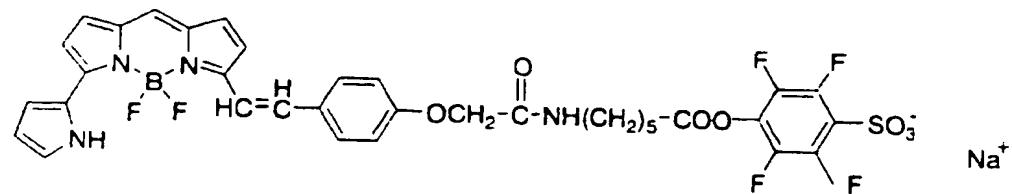
【化7】



【0021】

(9)

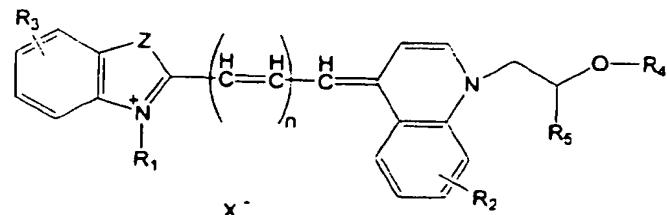
【化8】



【0022】

(10) 以下の一般式で表される化合物

【化9】



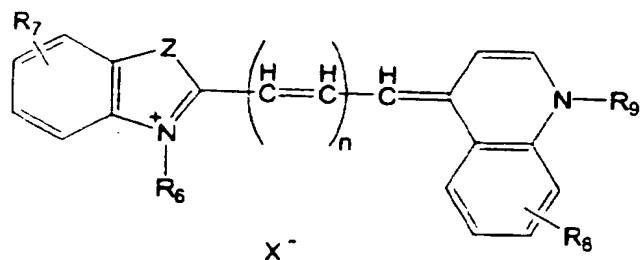
## 【0023】

(式中、R<sub>1</sub>は水素原子又は炭素数1～3のアルキル基；R<sub>2</sub>及びR<sub>3</sub>は水素原子、炭素数1～3のアルキル基又は炭素数1～3のアルコキシ基；R<sub>4</sub>は水素原子、アシル基又は炭素数1～3のアルキル基；R<sub>5</sub>は水素原子、置換されていてもよい炭素数1～3のアルキル基；Zは硫黄原子、酸素原子又は炭素数1～3のアルキル基で置換された炭素原子；nは1又は2；X<sup>-</sup>はアニオンである)

## 【0024】

(11) 以下の一般式で表される化合物

## 【化10】



## 【0025】

(式中、R<sub>1</sub>は水素原子又は炭素数1～18のアルキル基；R<sub>2</sub>及びR<sub>3</sub>は水素原子、炭素数1～3のアルキル基又は炭素数1～3のアルコキシ基；R<sub>4</sub>は水素原子、アシル基、又は炭素数1～18のアルキル基；Zは硫黄、酸素、あるいは炭素数1～3のアルキル基を有する炭素であり；nは0,1又は2であり；X<sup>-</sup>はアニオンである)。

## 【0026】

これらの色素のうち、(1)は市販品を入手できる。(2)、(3)は日本感光色素研究所(株)より入手できる。(5)～(9)は、Molecular Probes, Inc.より入手できる。

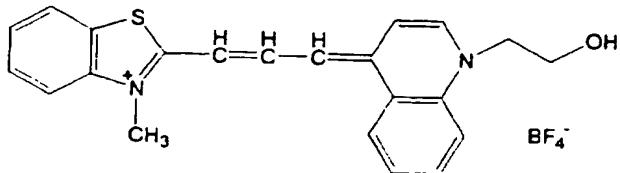
## 【0027】

また、(10)は、特開平9-104683号に、(11)は、特開平10-319010号に製造方法が記載されている。

## 【0028】

なお、(10)の一般式で示される色素のうち、特に、次の色素；

【化11】



が好適である。

【0029】

蛍光染色処理を施した試料中の各粒子から蛍光情報（蛍光の強度）を検出すれば、ある程度の蛍光強度を有する細菌と、蛍光強度をほとんど有さない灰雑物とを弁別できる。

【0030】

粒子の大きさ情報を検出する方法としては、調製した試料を微細孔に通し、通過時の試料の電気抵抗の変化から粒子のサイズを検出する電気抵抗法や、フローサイトメトリーによって粒子の発する散乱光強度や散乱光パルス幅を検出する方法を用いることができる。ここで粒子の大きさ情報とは、粒子径、粒子径に直行する方向の粒子の幅、粒子の体積など、粒子の大きさを反映した情報である。電気抵抗法により検出される電気抵抗の変化値や、フローサイトメトリーによって検出される散乱光信号の強度やパルス幅といったものを大きさ情報として使用できる。

【0031】

蛍光情報を検出する方法としては、フローサイトメトリーによって蛍光染色された粒子の発する蛍光強度を検出する方法を用いることができる。

【0032】

フローサイトメトリーとは、被検粒子を含む試料液の流れに対してレーザ光を照射し、粒子がレーザ光照射エリアを通過するごとに生じる散乱光や蛍光を検出し、検出した光学的情報に基づき粒子を分析する方法である。これら光学的情報は、ホトダイオードやホトマルチプライヤチューブ等の光電変換素子によりパルス状の電気信号として検出される。この電気信号につき、パルスのピーク高に基

づき信号強度を得たり、パルス幅に基づき発光時間を得たりすることができる。一般に、前方散乱光信号は粒子の大きさを反映し、蛍光信号は予め蛍光染色された粒子の染色度合いを反映する。

### 【0033】

スキャッタグラムとは、粒子の特徴を反映するものとして検出された複数の情報（本発明では粒子の大きさを表わす大きさ情報、及び蛍光情報）を座標軸にとり、検出された粒子を座標空間上の対応する位置にプロットしたものである。桿菌出現検体と球菌出現検体とを比較した場合、得られる大きさ情報が同じであれば、球菌より桿菌の方が得られる蛍光情報が大きい傾向にあり、スキャッタグラム上での分布状態に違いがあることを本願発明者は見出した。本発明は、この分布状態の違いに基づいて検体中の細菌が桿菌であるか球菌であるかを判定するものである。

### 【0034】

桿菌出現検体と球菌出現検体との分布状態の違いは、分布状態の傾きに表れる。以下、分布状態の傾きについて説明する。図6は桿菌出現検体から得られたスキャッタグラムの一例、図7は球菌出現検体から得られたスキャッタグラムの一例を示すものであり、X軸に蛍光強度（FL）を、Y軸に前方散乱光強度（Fs c）をとっている。各図中の領域B C Tは細菌が出現すると目される領域である。スキャッタグラム上で細菌の集団は一定方向へ（左下から右上の方向へ）伸びるように分布している。ここで、スキャッタグラムの座標空間における、前記一定方向の有する傾きが、分布状態の傾きである。図6と図7を比較すると、集団が右上へ伸びる方向のX軸に対する傾き（＝分布状態の傾き）は、桿菌出現検体（図6）よりも球菌出現検体（図7）の方が大きくなっている。このことから本発明は、分布状態の傾きに基づき、検体中の細菌が桿菌であるか球菌であるかを判別する。分布状態の傾きは、細菌のプロットの最大分散方向を求め、最大分散方向の傾きを求めて分布状態の傾きとすることができます。また細菌のプロットから計算される近似式の傾きを用いることができる。

### 【0035】

実施例

以下、本発明に係る自動細菌測定装置につき説明する。これによってこの発明が限定されるものではない。図1は自動細菌測定装置1の外観を実線で、装置内部の概略構成を破線で示したものである。装置の最前面には実線で示すように、各種設定入力を行なったり、また測定結果を表示出力するための液晶タッチパネル11、検体セット部カバー12、試薬セット部カバー13、スタートスイッチ14を備える。検体セット部カバー12を開けると、装置内部に設置された検体セット部に検体をセットできるようになっている。試薬セット部カバー13を開けると、装置内部に設置された試薬セット部に試薬をセットできるようになっている。検体セット部、試薬セット部については後述する。

### 【0036】

破線で示す装置の内部構成において、上部にはマイクロコンピュータや各種回路等からなる分析制御部400が配置されている。下部の手前側には、試料液を調製するための試料調製部200が配置されている。下部の奥側には試料液中の細菌から信号を検出するための検出部300が配置されている。

### 【0037】

#### 試料調製部

図2に自動細菌測定装置1の試料調製部200を示す。試料調製部200は、検体セット部201、試薬セット部202、インキュベータ（反応部）204、分注装置205を有している。検体セット部201には、検体の入った容器201aをセットするようになっている。この自動細菌測定装置1では、測定用の試薬として希釀液及び染色液を用いるようになっており、試薬セット部202には、希釀液の入った容器202a及び染色液の入った容器202bをそれぞれセットするようになっている。インキュベータ204には、検体と試薬を反応させるための容器204aをセットするようになっている。分注装置205は、図示しない駆動装置により上下左右に移動可能で、液体を定量して吸引・吐出できるようになっている。分注装置205は、検体セット部201にセットされた容器201a中の検体と、試薬セット部202にセットされた容器202a中の希釀液・容器202b中の染色液とを、それぞれ所定量吸引し、インキュベータ204にセットされた容器204aに吐出する。インキュベータ204は容器2

04aを所定の温度に保ち、検体と試薬を反応させ、試料液を調製する。調製された試料液は分注装置205によりサンプリングされ、試料容器112に供給される。試料調製部200の詳細な動作については後述する。

### 【0038】

#### 検出部

図3は検出部300の光学系と流体系を示す説明図である。シースフローセル107は、前記試料調製部200の試料容器112から供給された試料液を流すためのものであり、試料容器112と接続されている。またシースフローセル107は試料液をオリフィス111に向って上方へ噴射するノズル113と、シース液供給口110と、排液口114を備える。シースフローセル107の近傍には、シースフローセル107中を流れる試料液にレーザ光を照射するためのレーザ光源117、およびレーザ光を照射された試料液中の細菌から発せられた前方散乱光や蛍光を集光するための各種光学部品（コンデンサレンズ118、ビームストッパー119、コレクタレンズ120、ピンホール121を有する遮光板130、ダイクロイックミラー122、フィルタ123）が設けられている。また集光された蛍光を検出するための検出器としてホトマルチプライーチューブ124を、前方散乱光を検出するための検出器としてホトダイオード125を備えている。

### 【0039】

シース液供給口110には陽圧ポンプ147で加圧されたシース液容器109がバルブ105を介して接続される。排液口114は図示しない廃液チャンバーに接続される。ノズル113は、バルブ101を介して試料容器112に接続され、さらに、流路139とバルブ102を介して陰圧ポンプ148に接続され、流路139のバルブ102側にシリンジポンプ133が接続されている。

### 【0040】

以上の構成により検出部300は、試料調製部200で調製された試料液をシースフローセル107に流し、試料液中の細菌から前方散乱光信号や蛍光信号を検出する。検出した信号は分析制御部400へ送る。検出部300の詳細な動作については後述する。

## 【0041】

## 分析制御部

図4は分析制御部400の構成を示すブロック図である。分析制御部400は、CPU・RAM・ROM・ハードディスクなどからなるコンピュータ、各種回路等からなり、情報処理部134及び駆動回路部137としての機能を有する。図4に示すように情報処理部134は、分析部141と格納部145と制御部146を備え、分析部141はスキヤッタグラム作成部142と解析部143と判定部144を備える。

## 【0042】

格納部145は、装置各部の動作を制御する制御プログラムや、前記検出部300により試料中の細菌から得た信号を分析部141で分析するための分析プログラムを格納している。制御プログラムに基づき、制御部146は駆動回路部137を制御する。駆動回路部137は、制御部146の制御に基づき、図2に示す分注装置205や図3に示すシリンジポンプ133、バルブ101、102、105、陽圧ポンプ147、陰圧ポンプ148およびレーザ光源117を駆動する。

## 【0043】

## 全体制御

図15は、制御プログラムによる自動細菌測定装置1の全体制御を示すフローチャートである。操作者が試料調製部200（図2）の検体セット部201に、検体が入った容器201aを、試薬セット部202に、希釀液の入った容器202aと染色液の入った容器202bを、またインキュベータ204に、検体と試薬を反応させるための容器204a（この時点では空である）をセットした後、スタートスイッチ14を押すと、制御プログラムが起動し、ステップA（試料調製部制御）、ステップB（検出部制御）、ステップC（分析部制御）が順次実行される。これにより、試料調製部2、検出部3、分析部141が制御され、自動細菌測定測定装置1の一連の動作が自動的に実行される。上記ステップA、B、Cによる装置各部の動作の詳細を以下に説明する。

## 【0044】

### ステップA（試料調製部制御）

試料調製部制御による試料調製部200の動作を、図2を用いて説明する。まず分注装置205が、検体セット部201の容器201aから検体を定量し、インキュベータ204の容器204aに $50\mu\text{l}$ 分注する。次に、分注装置205は試薬セット部202の容器202aから希釈液を定量し、前記検体の分注された容器204aに $340\mu\text{l}$ を分注する。インキュベータ204は温度を $42^\circ\text{C}$ に保ちながら10秒間、検体と希釈液を攪拌する。そして分注装置205は試薬セット部202の容器202bから染色液を定量し、前記容器204aに $10\mu\text{l}$ 分注する。インキュベータ204は容器204aの温度を $42^\circ\text{C}$ に保ちながら20秒間振盪攪拌して染色液を反応させ、試料液を調製する。調製した約 $400\mu\text{l}$ の試料液が分注装置205によりサンプリングされ、試料容器112に供給する。試料容器112中の試料液は後述するように、検出部300のシースフローセル107に流される。

#### 【0045】

### ステップB（検出部制御）

検出部制御による検出部300の動作を、図3を用いて説明する。前記試料調製部200によって調製された試料液が試料容器112に収容されると、まず陰圧ポンプ148が駆動する。ここでバルブ101・102を所定時間開けると、試料が陰圧によりバルブ101と102の間の流路139に満たされる。その後、バルブ101・102を閉じる。

#### 【0046】

次に、シリンジポンプ133が一定流量で流路139の試料をノズル113へ押し出すことにより、ノズル113から試料がシースフローセル107に吐出される。それと同時にバルブ105を開けることによりシース液容器109からシースフローセル107にシース液が供給される。

#### 【0047】

これによって試料はシース液に包まれ、さらにオリフィス111によって細く絞られて流れる。試料液の流れを粒子径と同程度まで絞り込むことにより、試料液に含まれた粒子を一列に整列させて流すことができる。オリフィス111を通

過した試料液とシース液は排液口114から排出される。

#### 【0048】

オリフィス111を流れる試料液流126に対して、レーザ光源117からレーザ光が出射され、コンデンサレンズ118で絞られて照射される。

#### 【0049】

試料液中の粒子に当たらずそのままフローセル107を透過したレーザ光はビームストップ119で遮光される。レーザ光をうけた粒子から発せられる前方散乱光及び前方蛍光はコレクターレンズ120により集光され、遮光板130のピンホール121を通過する。そして、ダイクロイックミラー122に到達する。

#### 【0050】

散乱光より長波長の蛍光はそのままダイクロイックミラー122を透過し、フィルター123で更に散乱光が除かれた後にホトマルチプライヤーチューブ124で検出され、蛍光信号127（パルス状の電気信号）として出力される。

#### 【0051】

また、散乱光はダイクロイックミラー122で反射され、ホトダイオード125で受光されて散乱光信号128（パルス状の電気信号）として出力される。そして、蛍光信号127と前方散乱光信号128は図4に示す情報処理部134へ入力される。

#### 【0052】

ステップC（分析部制御）

検出部300から、情報処理部134に蛍光信号127と前方散乱光信号128が入力されると、分析部141により信号の解析が行われる。これが自動細菌測定装置1の全体制御におけるステップC（分析部制御）である。以下、分析部制御による分析部141の動作を、図5のフローチャートを用いて説明する。この動作手順を表わすプログラムは、他の制御プログラムと共に格納部145に予め格納されるが、外部の記録媒体や通信網から供給されてもよい。

#### 【0053】

まず、検出部300で検出された前方散乱光信号128と蛍光信号127が、分析部141のスキャッタグラム作成部142に入力される（ステップS1）。

### 【0054】

スキャッタグラム作成部142は、入力された前方散乱光信号128の最大ピーク値から前方散乱光強度Fscを、粒子の大きさ情報として算出する。また同様に、蛍光信号127から蛍光強度FLを蛍光情報として算出する。そして、得られたFLをX軸とし、FscをY軸とする二次元スキャッタグラムを作成する（ステップS2）。

### 【0055】

次に解析部143が、前記作成した二次元スキャッタグラム上に出現した粒子から細菌を弁別し、細菌として弁別された粒子を計数する（ステップS3）。図6は桿菌出現検体から作成された二次元スキャッタグラムの一例である。図に示すように、この二次元スキャッタグラムには、細菌と他の粒子とを弁別するために、細菌のみが出現すると目される領域BCTが予め設定されており、領域BCT内に出現した粒子が細菌とみなさる。この領域BCT内に出現した粒子のみを細菌として計数する。

### 【0056】

さらに解析部143は、領域BCT内に存在する粒子の、X-Y2次元空間における分散を求め、分散の中心点を通り分散が最大となる方向ベクトルEを求める。求めた方向ベクトルEを図6に示す。そして前記求めた方向ベクトルEを、図8に示すように単位ベクトル（長さが1のベクトル）に変換する。この単位ベクトルをX軸方向成分、Y軸方向成分に分解し、このうちのY軸方向成分の大きさをPとする（ステップS4）。Pは前記方向ベクトルEのX軸に対する傾き度合いを表わす値である。

### 【0057】

図7は、球菌出現検体から作成された二次元スキャッタグラムの例であり、図6同様に方向ベクトルEを求めた様子を示す。図6と図7を比較して明らかにように、方向ベクトルEのX軸に対する傾き度合いは桿菌出現検体（図6）よりも球菌出現検体（図7）の方が大きくなる。よってPの値も、桿菌出現検体（図6）より球菌出現検体（図7）の方が大きくなる。

### 【0058】

そこで、判定部144は、前記解析部143が算出したPの値を所定値A（ここでは、 $A = 0.68$ ）と比較する（ステップS5）。 $P \geq A$ の場合には、検体に含まれる細菌は球菌であると判定し（ステップS6、S7）、 $P < A$ の場合には、桿菌であると判定する（ステップS6、S8）。

#### 【0059】

判定部144による判定結果は、ステップS2で作成された二次元スキャッタグラムや、ステップS3で計数された細菌数と併せて液晶タッチパネル11に出力される（ステップS9）。液晶タッチパネル11に出力された画面の例を図16に示す。スキャッタグラム、菌種の判定結果、菌数が表示されている。菌種の判定結果を示す欄では、「桿菌」、「球菌」のうち「桿菌」に印がついており、判定結果が桿菌であったことを示している。

#### 【0060】

##### 検体測定

以下、上記に説明した自動細菌測定装置1を用いて検体を測定し、菌種を判定した結果について説明する。

#### 【0061】

##### 検体

検体として、次の（a）～（g）を用いた。

- （a）*E. aerogenes*（桿菌）が出現したヒトの尿
- （b）*E. coli*（桿菌）が出現したヒトの尿
- （c）*S. aureus*（黄色ブドウ球菌）が出現したヒトの尿
- （d）*S. epidermidis*（表皮ブドウ球菌）が出現したヒトの尿
- （e）*E. coli*（桿菌）を混釀させたハートインフュージョン液体培地（菌数 $6 \times 10^5$ 個/mL程度）
- （f）*P. aeruginosa*（小型の桿菌）を混釀させたハートインフュージョン液体培地（菌数 $6 \times 10^5$ 個/mL程度）
- （g）*S. aureus*（黄色ブドウ球菌）を混釀させたハートインフュージョン液体培地（菌数 $6 \times 10^5$ 個/mL程度）

#### 【0062】

## 測定用試薬

検体を処理して測定用試料を調製するための試薬として、以下の組成の希釀液と染色液を使用した。

### 【0063】

#### 希釀液

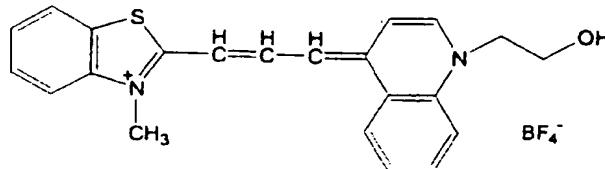
|                        |             |
|------------------------|-------------|
| クエン酸                   | 100 mM      |
| 硫酸ナトリウム                | 90 mM       |
| アミド硫酸                  | 100 mM      |
| NaOH                   | pH 2.5 になる量 |
| テトラデシルトリメチルアンモニウムプロマイド | 1 g         |
| 精製水                    | 1リットル       |

### 【0064】

#### 染色液

|           |       |
|-----------|-------|
| 以下の構造式の色素 | 40 mg |
|-----------|-------|

### 【化12】



エチレングリコール

### 【0065】

前記検体 (a)、(b)、(c)、(d) をそれぞれ測定した結果得られた二次元スキャッタグラムを図11の (a)、(b)、(c)、(d) に示す。X軸 (横軸) にはFLを、Y軸 (縦軸) にはFscをとっている。

### 【0066】

図12は、図11の各二次元スキャッタグラムから算出されたPの値、および前記フローチャートに基づく菌種の判定結果を示す。桿菌出現検体から算出されるPの値は、球菌出現検体から算出されるPの値と比べて小さい値となることが

わかる。また各検体から得られたPの値と所定値A（ここではA=0.68）とを比較した結果に基づく菌種の判定結果は、実際の菌種と一致していることがわかる。

### 【0067】

前記検体（e）、（f）、（g）を測定した結果得られた二次元スキャッタグラムを図13の（e）、（f）、（g）に示す。X軸（横軸）にはFLを、Y軸（縦軸）にはFscをとっている。

### 【0068】

図14は、図13の各二次元スキャッタグラムから算出されたPの値、および前記フローチャートに基づく菌種の判定結果を示す。桿菌出現検体から算出されるPの値は、球菌出現検体から算出されるPの値と比べて小さい値となることがわかる。また各検体から得られたPの値と所定値A（ここではA=0.68）とを比較した結果に基づく菌種の判定結果は、実際の菌種と一致していることがわかる。

### 【0069】

大型の桿菌であるE.coliと小型の桿菌であるP.aeruginosaとを比較すると、二次元スキャッタグラム上でP. aeruginosaの方がFscに関し低値の位置に多く出現しており、分布の仕方に違いが見られる。しかしPの値に基づく菌種判定により、いずれも正しく桿菌として判定されている。

### 【0070】

#### 判定の精度

対照法として平板寒天培養法により菌種を判定したヒトの尿検体（桿菌出現検体53検体および球菌出現検体26検体）を、上記自動細菌測定装置1によって測定し、菌種を判定した場合の判定精度を図10に示す。図10から分かるように、桿菌出現検体では、47検体について判定が一致し（精度88.7%）、球菌出現検体では21検体が一致している（精度80.1%）。また、合計すると、76検体の内、68検体について判定が一致している（精度86.1%）。従って、この発明は80%以上の判定精度を有するといえる。

### 【0071】

図9は図5の手順の変形例を示すフローチャートであり、図5のステップS6において $P < A$ の場合のみの手順を変更し、その他の手順は図5と同等としたものである。

#### 【0072】

つまり、図9に示すフローチャートにおいて判定部144は、 $P < A$ の場合、パラメータPを、Aより小さい所定値B（例えば $B = 0.60$ ）と比較する（ステップS6a）。 $P < B$ の場合（ステップS6b）には検体に含まれる粒子は桿菌と判定され（ステップS8）、 $A > P \geq B$ の場合には判定困難と判定される（ステップS6b, S6c）。

#### 【0073】

これらの判定結果に応じた画面が、液晶タッチパネル11に出力される（ステップS9）。また液晶タッチパネル11には、ステップS2で作成されたスキャッタグラムや、ステップS3で計数された細菌数も併せて出力される。液晶タッチパネル11に出力された画面の例を図17に示す。二次元スキャッタグラム、菌種の判定結果、菌数が表示されている。菌種の判定結果を示す欄では、「桿菌」、「球菌」、「判定困難」のうち「判定困難」に印がついており、この検体は菌種の判定が困難であったことを示している。

#### 【0074】

図9に示すフローチャートのステップS6bで $A > P \geq B$ の場合、図17のように球菌・桿菌いずれの菌種かを判定せず、単に判定困難である旨を出力してもよいが、球菌・桿菌いずれかの菌種の存在を示唆しつつ、示唆していない方の種類の菌も多く存在する可能性がある旨を警告するよう出力してもよい。

#### 【0075】

##### 【発明の効果】

この発明によれば、細菌の大きさ情報と蛍光情報によって作成したスキャッタグラムの分布状態から、検体中の細菌が桿菌であるか球菌であるかを判定することができる。細菌の培養を必要とせずにきわめて能率よく菌種を判定することができる。

##### 【図面の簡単な説明】

**【図1】**

この発明の自動細菌測定装置の斜視図である。

**【図2】**

図1に示す装置の試料調製部を示す斜視図である。

**【図3】**

この発明に係る検出部の光学系と流体系を示す説明図である。

**【図4】**

この発明に係る分析制御部を示すブロック図である。

**【図5】**

この発明の動作を示すフローチャートである。

**【図6】**

この発明におけるスキャッタグラムの一例を示す図である。

**【図7】**

この発明におけるスキャッタグラムの他の例を示す図である。

**【図8】**

この発明に係る単位ベクトルの説明図である。

**【図9】**

図5に示すフローチャートの変形例を示すフローチャートである。

**【図10】**

この発明の判定精度を示す説明図である。

**【図11】**

この発明における各種スキャッタグラムの例を示す図である。

**【図12】**

この発明における図11に基づく菌種判定結果を示す説明図である。

**【図13】**

この発明における各種スキャッタグラムの例を示す図である。

**【図14】**

この発明における図13に基づく菌種判定結果を示す説明図である。

**【図15】**

この発明の自動細菌測定装置の全体制御を示すフローチャートである。

【図16】

この発明の自動細菌測定装置が表示出力した画面の一例を示す説明図である。

【図17】

この発明の自動細菌測定装置が表示出力した画面の一例を示す説明図である。

【符号の説明】

1 自動細菌測定装置

1 1 液晶タッチパネル

1 2 検体セット部カバー

1 3 試薬セット部カバー

1 4 スタートスイッチ

1 0 1 バルブ

1 0 2 バルブ

1 0 5 バルブ

1 0 7 シースフローセル

1 0 9 シース液容器

1 1 0 シース液供給口

1 1 1 オリフィス

1 1 3 ノズル

1 1 4 排液口

1 1 7 レーザ光源

1 1 8 コンデンサレンズ

1 1 9 ビームストッパー

1 2 0 コンタクトレンズ

1 2 1 ピンホール

1 2 2 ダイクロイックミラー

1 2 3 フィルター

1 2 4 ホトマルチプライヤチューブ

1 2 5 ホトダイオード

130 遮光板

133 シリンジポンプ

139 流路

147 陽圧ポンプ

148 陰圧ポンプ

200 試料調製部

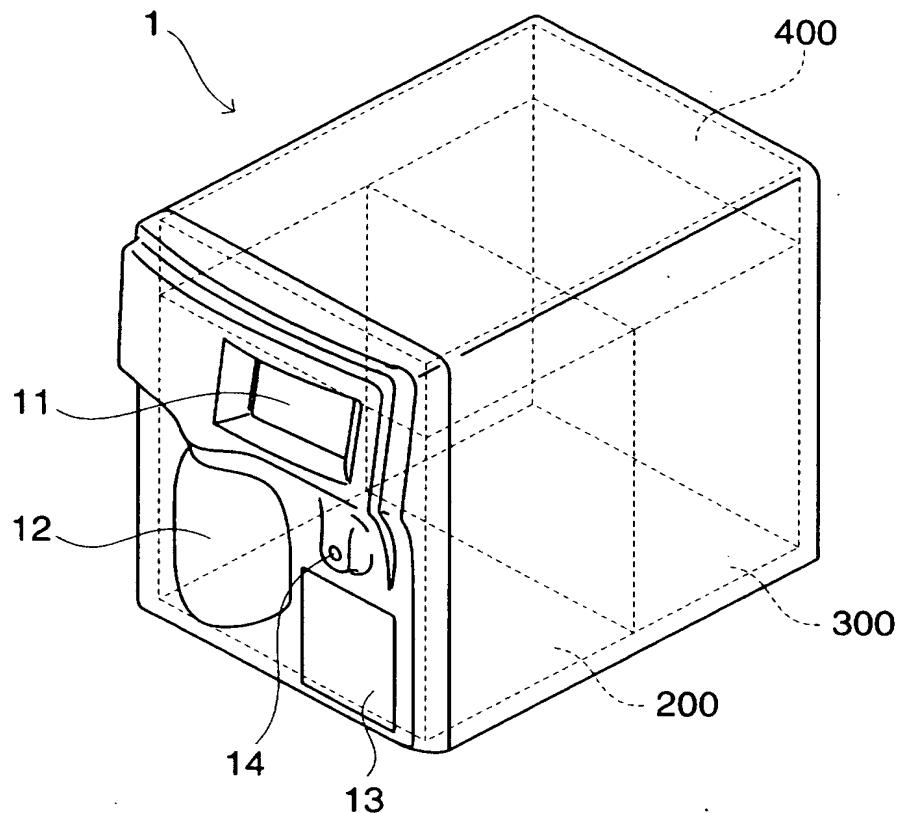
300 検出部

400 分析制御部

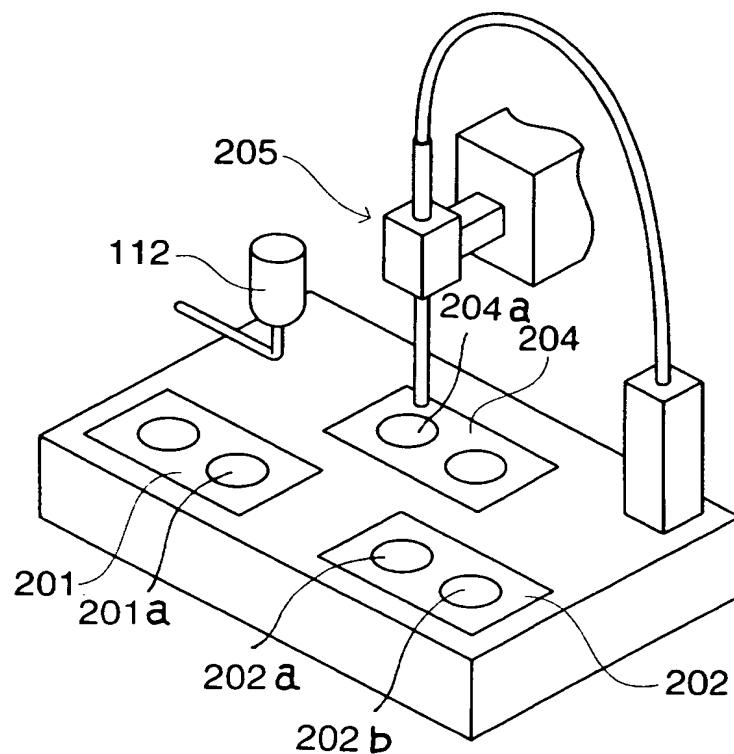
【書類名】

図面

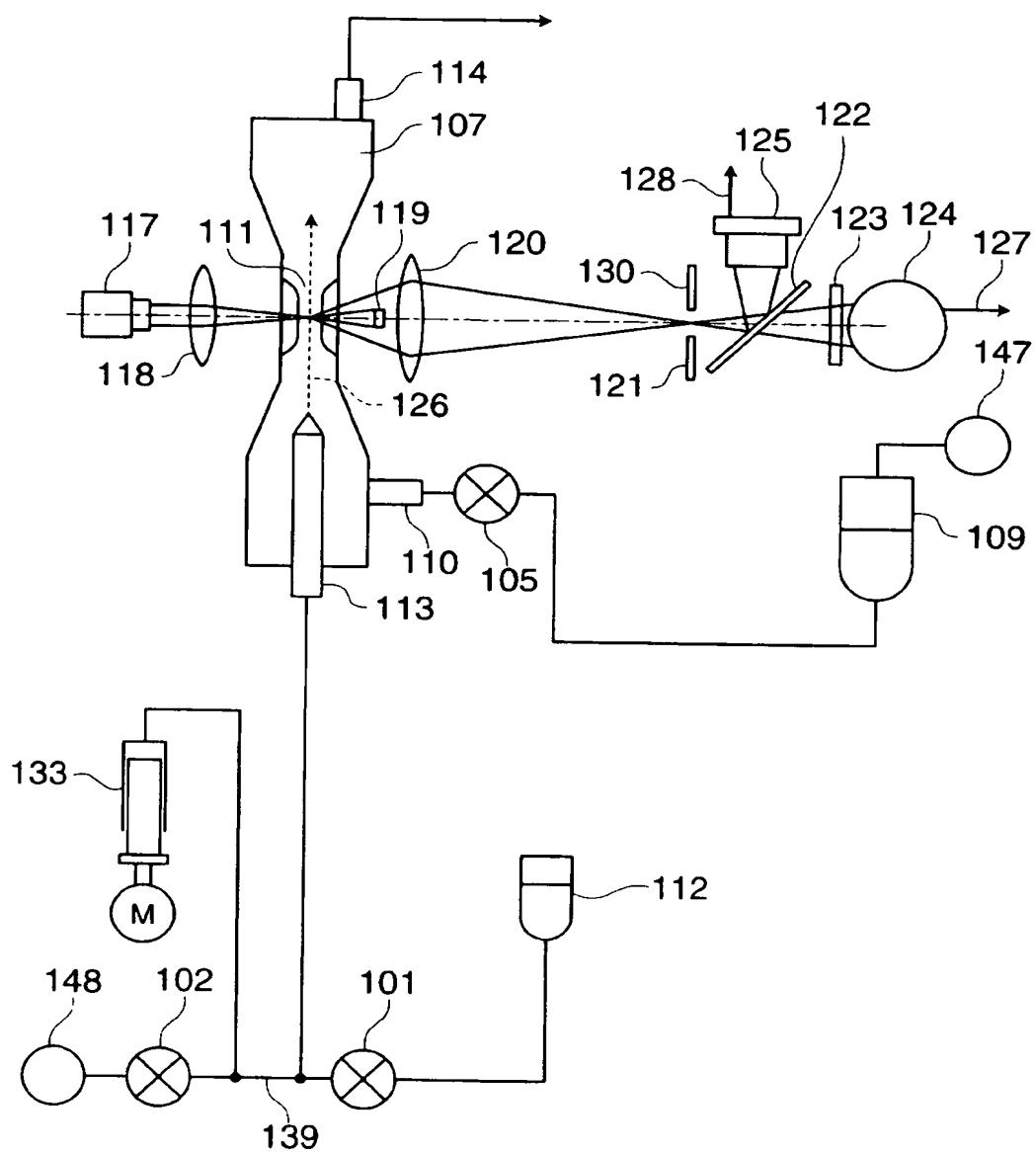
【図1】



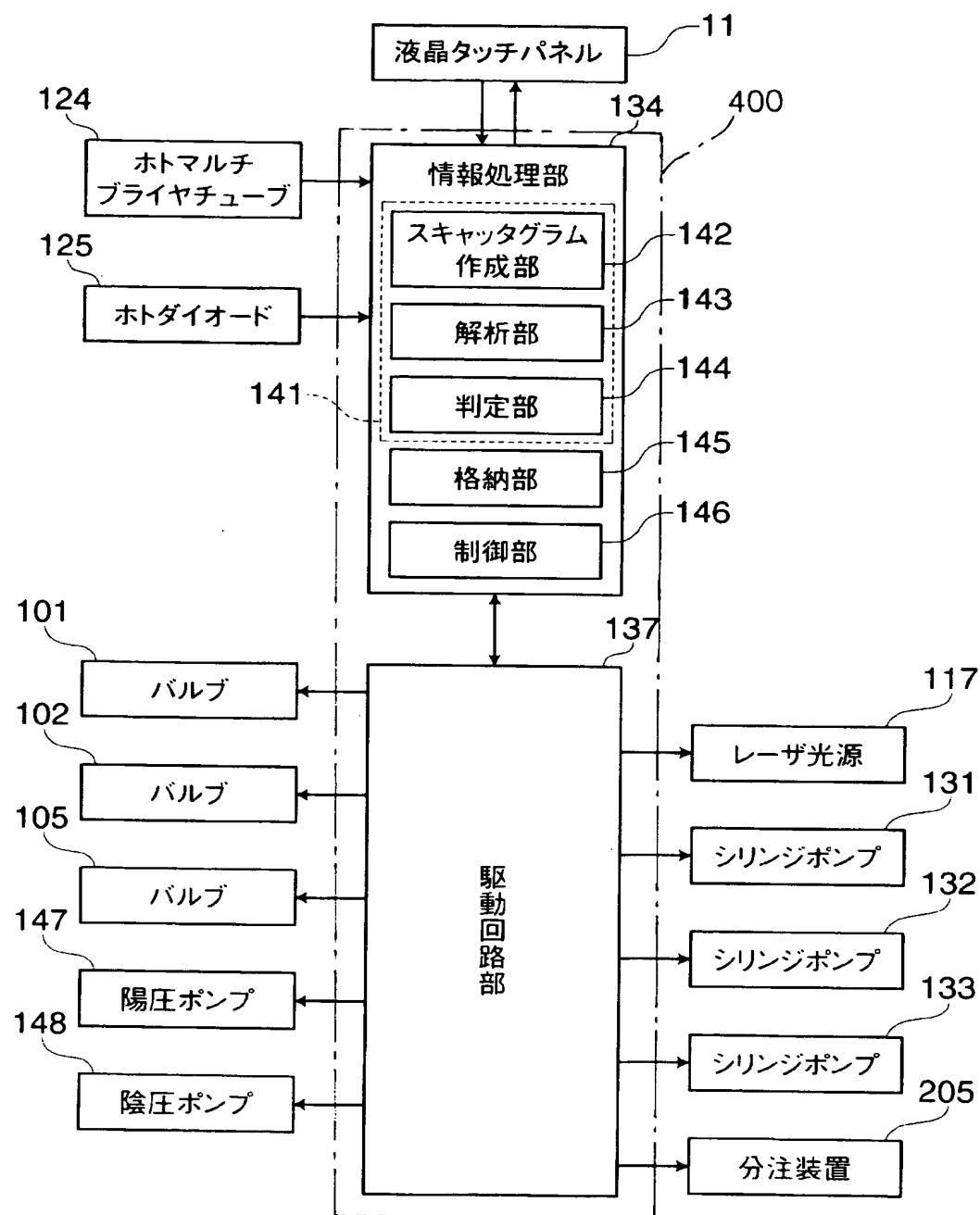
【図2】



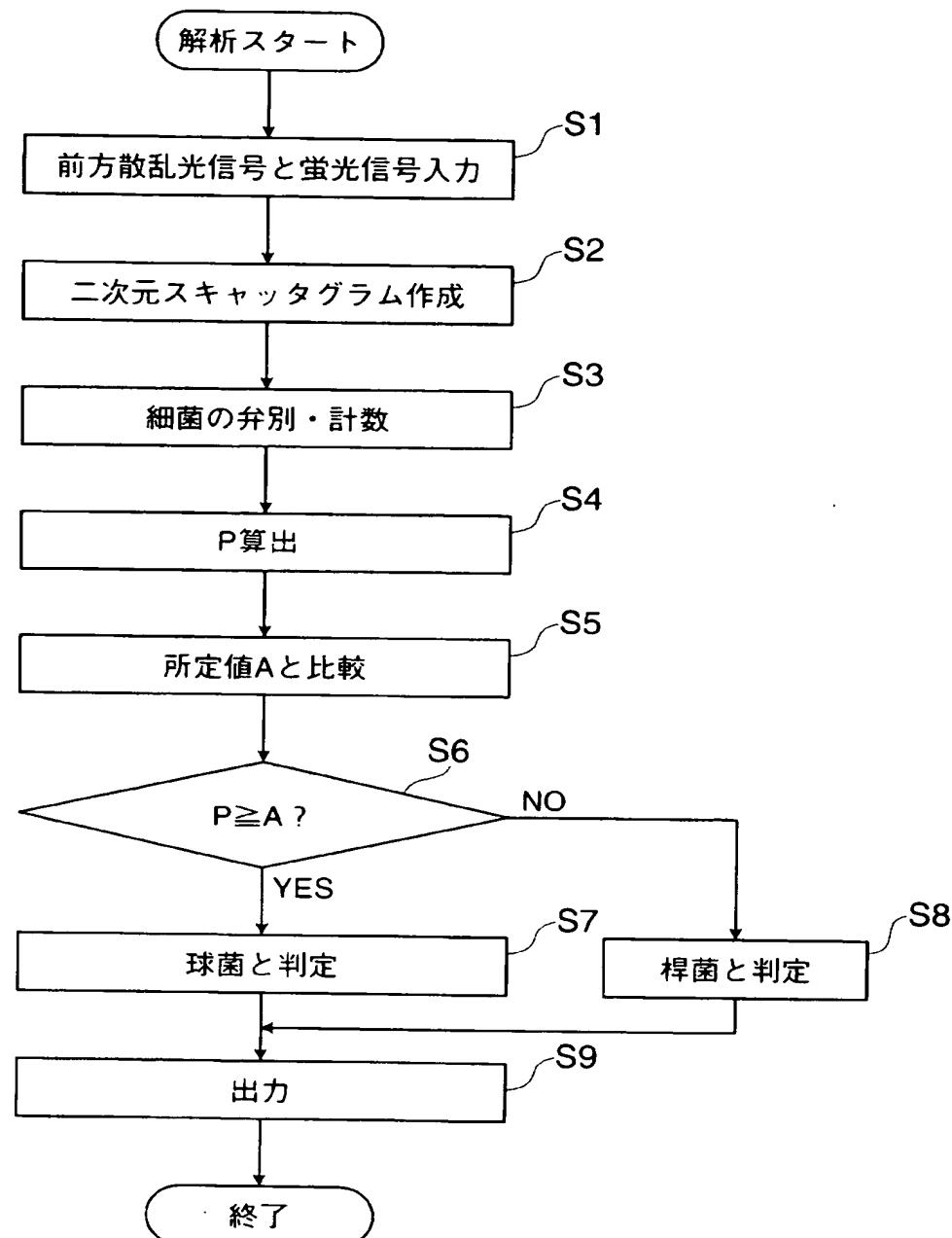
【図3】



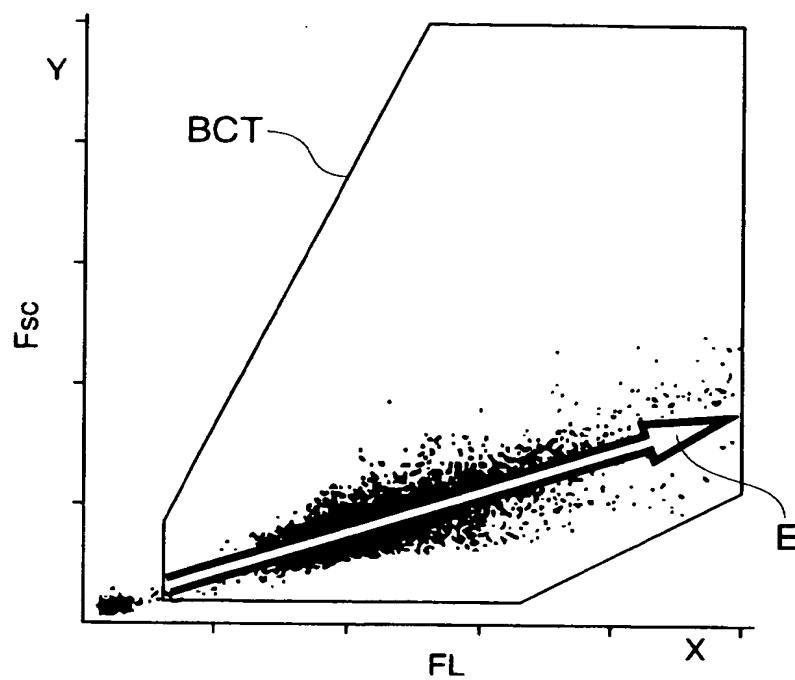
【図4】



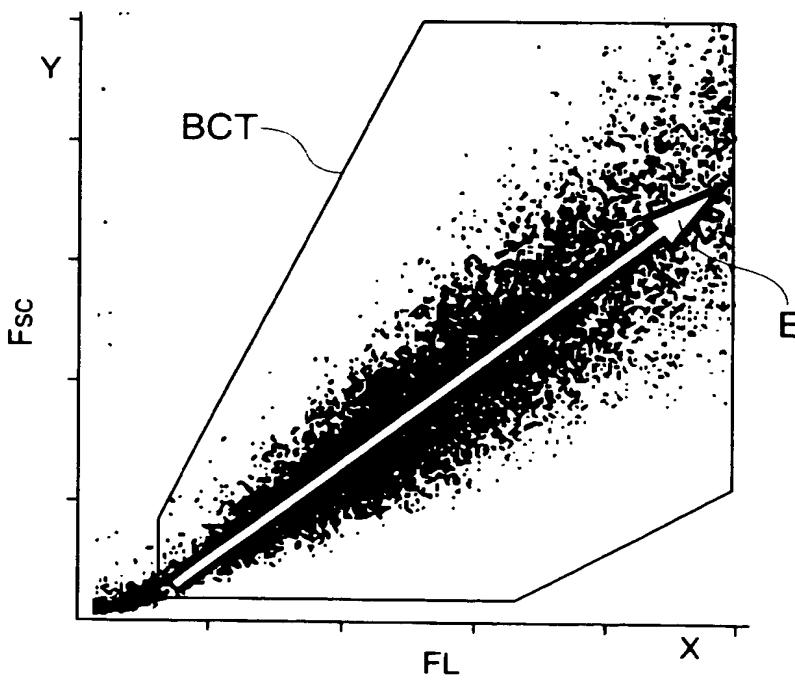
【図5】



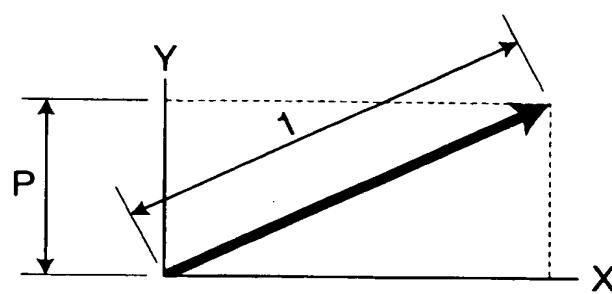
【図6】



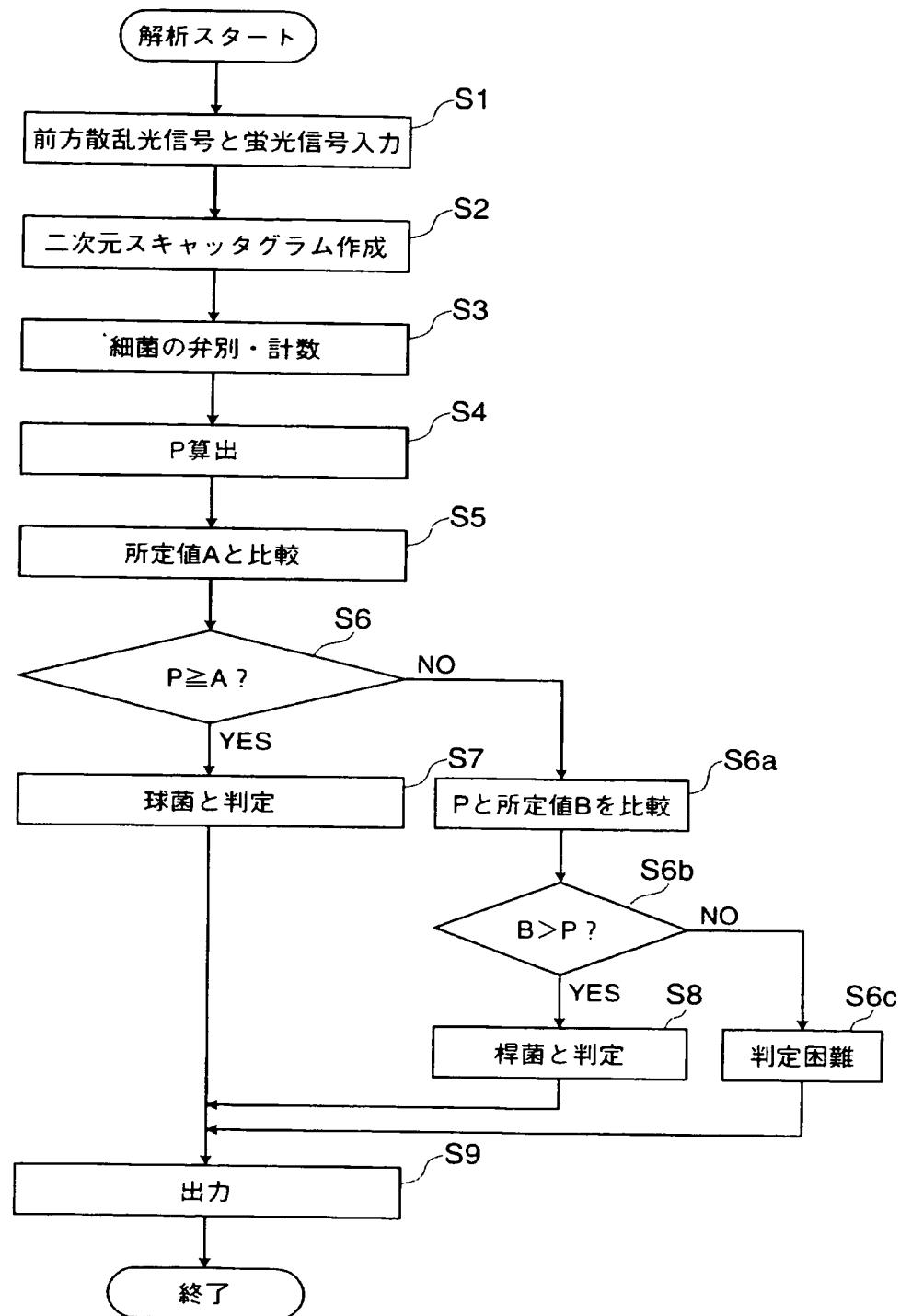
【図7】



【図8】



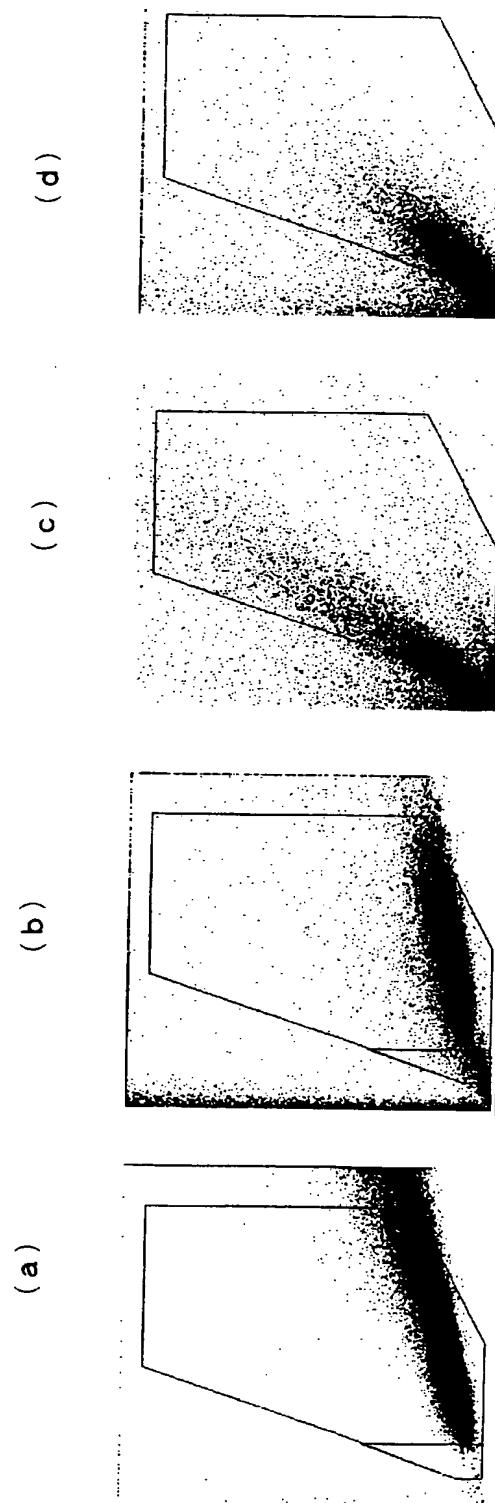
【図9】



【図10】

|       | 桿菌出現<br>検体 | 球菌出現<br>検体 | 合計   |
|-------|------------|------------|------|
| 検体数   | 53         | 26         | 79   |
| 一致数   | 47         | 21         | 68   |
| 精度(%) | 88.7       | 80.1       | 86.1 |

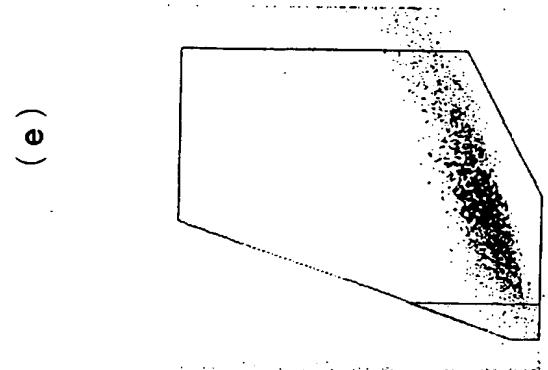
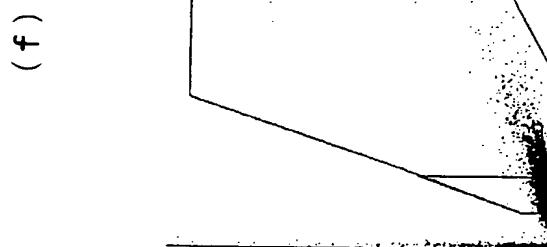
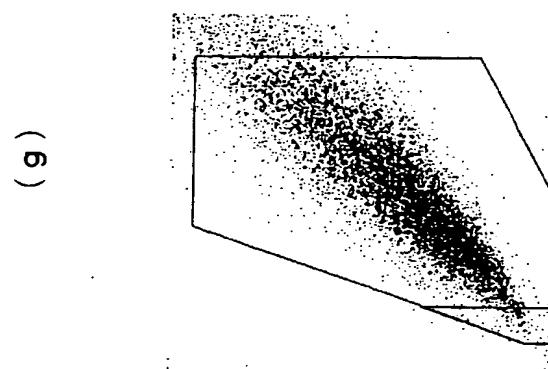
【図11】



【図12】

|     | 菌種                         | Pの値   | 判定結果 |
|-----|----------------------------|-------|------|
| (a) | <i>E. aerogenes</i> (桿菌)   | 0. 27 | 桿菌   |
| (b) | <i>E. coli</i> (桿菌)        | 0. 23 | 桿菌   |
| (c) | <i>S. aureus</i> (球菌)      | 0. 83 | 球菌   |
| (d) | <i>S. epidermidis</i> (球菌) | 0. 77 | 球菌   |

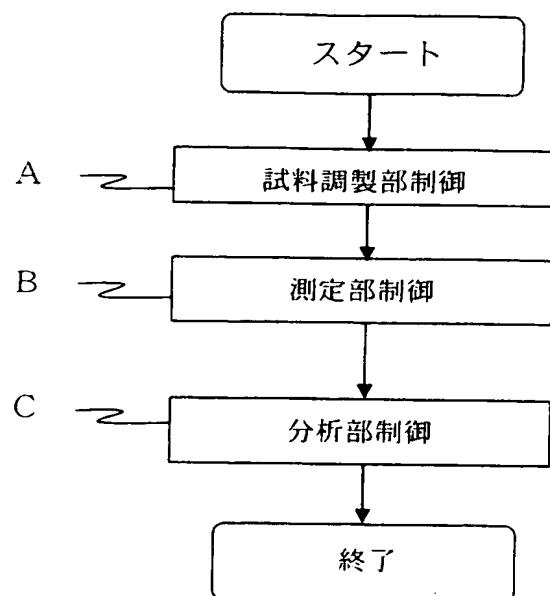
【図13】



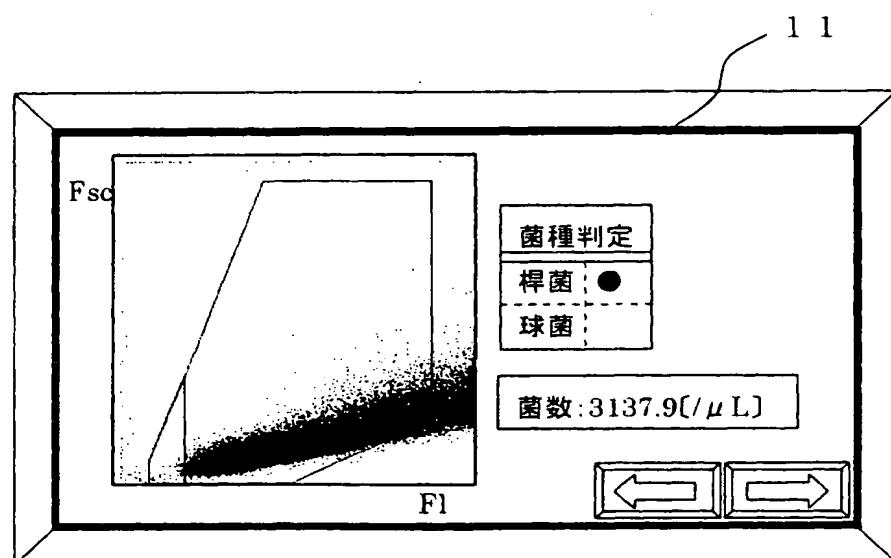
【図14】

|     | 菌種                 | Pの値  | 判定結果 |
|-----|--------------------|------|------|
| (e) | E. coli (桿菌)       | 0.35 | 桿菌   |
| (f) | P. aeruginosa (桿菌) | 0.21 | 桿菌   |
| (g) | S. aureus (球菌)     | 0.74 | 球菌   |

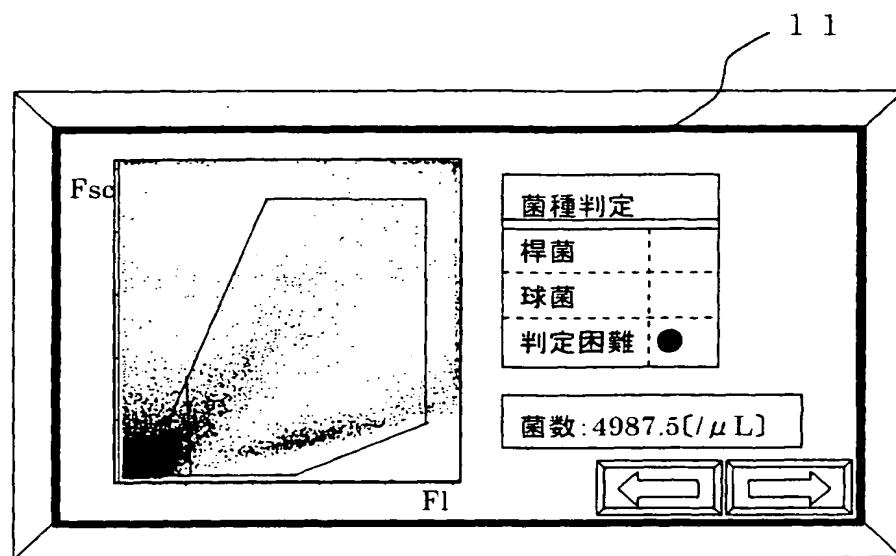
【図15】



【図16】



【図17】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 検体を培養することなく検体中の細菌の種類が桿菌であるか球菌であるか判定すること。

【解決手段】 液体中の細菌を蛍光染色して試料を調製し、調製した試料中の各細菌から細菌の大きさ情報と、細菌の発する蛍光の強度を表わす蛍光情報とを検出し、検出された大きさ情報と蛍光情報をパラメータとするスキャッタグラムを作成し、スキャッタグラム上の細菌の分布状態を解析し、解析結果に基づいて検体中の細菌の種類が桿菌であるか球菌であるかを判定する。

【選択図】 図5

特願 2003-106569

出願人履歴情報

識別番号 [390014960]

1. 変更年月日 1998年10月 7日  
[変更理由]

名称変更  
住所変更  
神戸市中央区脇浜海岸通1丁目5番1号  
シスメックス株式会社

住所  
氏名